

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 802**

21 Número de solicitud: 201600262

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.09.2017

71 Solicitantes:

GALVEZ JEREZ, Víctor Manuel (100.0%)
Plaza de Can Orell 2
07320 Santa María del Camí (Illes Balears) ES

72 Inventor/es:

GALVEZ JEREZ, Víctor Manuel

54 Título: **Molécula de ácido nucleico y método para modificar de forma bialélica un gen diana o locus presente en el material genético de una célula**

57 Resumen:

Molécula de ácido nucleico y método para modificar de forma bialélica un gen diana o locus presente en el material genético de una célula.

El objeto de la invención es el de proporcionar una molécula de ácido nucleico y un método que modifique en una célula ambos alelos de un gen diana o región del genoma en un solo paso de transfección, automatizando y reduciendo los procesos de selección y cultivo, mejorando así el proceso de edición genética actual y permitiendo generar estrategias terapéuticas contra enfermedades genéticas y virales como por ejemplo el SIDA (mediante la edición del gen CCR5). La molécula está compuesta por la codificación de todos los elementos necesarios para i) cortar un alelo del gen diana, ii) ser utilizada por la maquinaria de reparación de la célula como plantilla para reparar el corte, iii) integrar dentro del gen reparado todos los elementos de edición para editar el alelo restante iv) y posteriormente eliminar dichos elementos en ambos alelos dejando únicamente la modificación genética deseada en el gen de forma homocigota.



Figura 4

ES 2 634 802 A1

DESCRIPCIÓN

Molécula de ácido nucleico y método para modificar de forma bialélica un gen diana o locus presente en el material genético de una célula

5

SECTOR DE LA TECNICA

La presente invención pertenece al sector de la biotecnología y biomedicina, más en concreto al de terapia génica y edición genómica.

10

El objeto principal de la presente invención es el diseño de una molécula de ácido nucleico y de un método para modificar un gen diana o locus del material genético presente en la célula. Esta modificación es permanente y de carácter homocigota, estando presente de forma idéntica en ambos alelos del gen diana o locus seleccionado. El sistema es muy versátil pudiendo editar el genoma de cualquier célula eucariota de cualquier organismo en un corto periodo de tiempo.

15

ESTADO DE LA TECNICA, ANTECEDENTES

20

El proceso de edición genética por recombinación homóloga actual requiere del uso de al menos dos vectores que tienen que ser transfectados en la célula; El primero codifica la herramienta molecular que expresada en la célula genera un doble corte en el gen diana (a partir de ahora nucleasas); El segundo vector (a partir de ahora vector de recombinación homóloga), presenta unas regiones de homología (con las regiones del gen diana circundantes al corte) que flanquean una región donde se encuentran las modificaciones que se quiere insertar en el gen. Tras el corte del gen diana por parte de las nucleasas existe una posibilidad de que la maquinaria celular repare dicho corte por el mecanismo de reparación por homología utilizando como plantilla el vector de recombinación homóloga incorporando en la secuencia del gen las modificaciones requeridas.

25

30

Este proceso de edición genética, si bien es válido para editar uno de los dos alelos del gen diana, es ineficaz cuando se pretende modificar ambos alelos por varios motivos: i) Se necesita la co-transfección simultánea de dos o más vectores (vectores de expresión de las nucleasas y vector de recombinación homóloga) en la célula. ii) El corte provocado por las nucleasas puede ser reparado por la vía NHEJ^[1] (*non-homologous end joining* por sus siglas en inglés) proceso de reparación por el cual se unen los dos extremos generando mutaciones aleatorias, o por la vía de reparación por recombinación homóloga, que utiliza como plantilla de homología el segundo alelo del gen presente en el material genético de

35

la célula; iii) La expresión de las nucleasas es episomal y por tanto transitoria; iv) La edición genética de ambos alelos es extremadamente rara ya que requiere de un corte para cada uno de los dos alelos del gen y de un proceso de recombinación homóloga utilizando como plantilla de homología el vector de recombinación homóloga para ambos cortes. Este último punto está condicionado por probabilidades sucesivas para cada paso de reacción que disminuyen de forma dramática el rendimiento, siendo el evento de recombinación homóloga entre el vector de recombinación homóloga y el material genético de la célula muy infrecuente, requiriendo de transfecciones múltiples en un gran volumen de células para obtener un solo evento.

10

Por todos estos puntos es prácticamente imposible seleccionar una célula o clon que presente el gen editado en sus dos alelos de forma homocigota (portando la misma secuencia editada en sus dos alelos), frecuentemente se necesita un proceso de edición secuencial, que conlleva una manipulación *in-vitro* excesiva y que frecuentemente obtiene modificaciones diferentes para cada alelo, siendo imposible establecer un mecanismo de detección que diferencie las células que presenten una corrección en las dos copias del gen frente a las células con solo una copia corregida.

15

El objeto de la presente invención no solo circunviene las presentes dificultades sino que i) aumenta la eficiencia del proceso de edición genómica, ii) utiliza la maquinaria de reparación celular a su favor para editar ambos alelos del gen diana de forma homocigota y iii) posibilita la detección, el aislamiento y expansión de las células modificadas, permitiendo una caracterización exhaustiva que garantiza una estabilidad genética análoga a las células nativas, lo que posibilita su uso futuro en terapia celular.

25

EXPLICACION DE LA INVENCION

El objeto de la invención es el de proporcionar una molécula de ácido nucleico y un método que modifique de forma bialélica el gen diana o región del genoma seleccionada.

30

Un aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico, formada por varias regiones siendo su estructura la siguiente: Dos regiones de homología con el gen o locus del material genético a editar (regiones-H) flanquean dos regiones que conforman un elemento transponible (regiones-T) y que a su vez flanquean una región que codifica un conjunto de proteínas necesarias para que el método se lleve a cabo (región-R).

35

Adicionalmente la molécula de ácido nucleico constará de una o más regiones que contienen las modificaciones génicas deseadas que se quiere incorporar de forma permanente en el material genético de la célula (región-E). Dicha región-E podrá estar presente dentro de las regiones-H en forma de al menos una modificación puntual de la

secuencia o estar intercalada entre las regiones H-T y/o T-H codificando, por ejemplo y sin límite, una secuencia, parte o todo un gen, un intrón o exón.

Funcionamiento resumido del proceso de edición genómica bialélica una vez introducida la molécula de ácido nucleico en la célula:

- 5 La región-R presente en la molécula objeto de la invención codifica varias proteínas entre ellas proteínas nucleasas, según se define en las reivindicaciones. Estas nucleasas una vez expresadas reconocen y efectúan un corte en un sitio concreto del gen diana o locus del material genético de la célula, el corte se produce en al menos un alelo del gen diana o locus.
- 10 Las dos regiones-H presentes en la molécula tienen una alta homología con las regiones circundantes al corte del alelo, estas regiones-H son reconocidas por el mecanismo de reparación por recombinación homóloga de la célula y son utilizadas como plantilla para reparar el corte, integrando en este proceso la molécula de ácido nucleico en el alelo reparado.
- 15 Una vez integrada la molécula de ácido nucleico en uno de los alelos, la expresión de los genes contenidos en la región-R pasa a ser estable y por ende la expresión de las nucleasas que efectúan un segundo corte en el alelo restante del gen o locus diana.

El alelo cortado se repara gracias al sistema de reparación por recombinación homóloga presente en la célula utilizando como plantilla el alelo previamente modificado, de esta forma la modificación del gen pasa de ser heterocigota (modificación presente en un solo alelo) a homocigota (modificación presente en ambos alelos).

Una vez integrada la molécula de ácido nucleico objeto de la invención en ambos alelos del gen diana se activa el elemento transponible codificado en la molécula de ácido nucleico por las dos regiones-T. Esta activación elimina todas las secuencias no deseadas (región-T, región-R y región-T) dejando únicamente en el gen diana o locus las modificaciones deseadas (región-E). Dichas modificaciones serán de carácter permanente e idénticas en ambos alelos.

Otro aspecto de la invención se refiere al método para modificar el material genético de la célula de forma que la modificación o edición génica resultante esté presente en los dos alelos del gen diana o de la región del material genético diana. Este método comprende las siguientes etapas:

- i) Proporcionar e introducir en la célula la molécula de ácido nucleico; ii) Seleccionar las células que hayan integrado la molécula de ácido nucleico dentro de ambos alelos del gen diana o locus; iii) Provocar la escisión de parte de la molécula de ácido nucleico de forma que solo las modificaciones deseadas (tales como

sustituciones, eliminaciones o adiciones en la secuencia) permanezcan en ambos alelos del material genético de la célula modificada; iv) Seleccionar las células que presenten las modificaciones deseadas en ambos alelos.

5 La molécula de ácido nucleico objeto de la invención y su método pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades hereditarias tanto de carácter recesivo como dominante ya que este método posibilita la edición genómica de ambos alelos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico como composición terapéutica y su uso como medicamento.

10 Otro aspecto de la invención se dirige de forma preferente a un tratamiento y/o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida resultado de la infección del virus VIH o de una enfermedad monogénica y que comprende administrar una cantidad terapéutica efectiva de la molécula de ácido nucleico en el organismo o sujeto afectado y/o administrar células del propio organismo modificadas previamente como ya se ha explicado. El
15 organismo o sujeto en cuestión puede ser un humano.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

20 Para una mejor comprensión de la invención se acompaña a la misma con una hoja de dibujos a título meramente ilustrativos y no limitativos de la invención.

La figura-1 muestra un diagrama de la estructura de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención, donde se detalla el orden de las regiones-H, regiones-T y región-R en el sentido 5´-3´ de la transcripción. En este diagrama no se detalla la región-E ni la
25 composición de secuencias que confirman la región-R.

La figura-2 muestra un diagrama de la estructura de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención, donde se detallan ejemplos de localización de las modificaciones puntuales y de las regiones-E, (figura.2a,b,c,d).

30

La figura-3 muestra un diagrama de una realización particular de la molécula de ácido nucleico (figura.3a), diseñada para eliminar una secuencia específica del gen diana o locus presente en la célula y del proceso de edición génica efectuado según la realización de la invención (figura.3b,c,d).

35

La figura-4 muestra un diagrama de la estructura de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención, donde se detalla las secuencias N, M, S y P presentes dentro de la región-

R, el orden y disposición de estas secuencias es irrelevante en el sentido 5'-3' de la transcripción. En este diagrama no se detalla la región-E.

5 La figura-5 muestra un diagrama del mecanismo de acción de la molécula para editar el material genético de la célula representado en varias etapas (a, b, c, d, y e) de forma que la modificación o edición génica resultante esté presente en los dos alelos del gen diana o de las dos copias de la región del material genético diana.

EXPOSICION DETALLADA DE LA INVENCION

10

Un aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico compuesta en sentido de la transcripción 5'-3' por las siguientes regiones: Una región de homología con la región o locus del material genético a editar (H); una región que codifica para el inicio de un elemento transponible (T); una región que codifica para un conjunto de proteínas
15 necesarias para que el método objeto de la invención pueda llevarse a cabo (R); una región que codifica para el final del elemento transponible (T) y una región de homología con la región o locus del material genético a editar (H). La molécula de ácido nucleico tendrá la siguiente estructura básica H-T-R-T-H en sentido de la transcripción 5'-3' (figura.1).

20 Las dos regiones de homología (a partir de ahora referida como regiones-H) presentes en la molécula de ácido nucleico conforman los brazos de homología (brazo de homología 5' y brazo de homología 3' dispuestos según el sentido de la transcripción 5'-3'). Estas regiones-H son necesarias para que la molécula de ácido nucleico pueda ser utilizada como plantilla del sistema de reparación por recombinación homóloga y por ende pueda
25 integrarse en el material genético de la célula. Estas regiones-H son análogas a las regiones del genoma celular presentes antes y después del sitio de corte de las nucleasas (definidas más adelante).

Se entiende por región de homología una región idéntica a una secuencia diana o con un porcentaje de analogía muy alto a la secuencia original (secuencia presente en el gen o
30 locus diana de la célula que se desea modificar) de forma que ambas secuencias puedan ser reconocidas e intercambiadas mediante el proceso de recombinación homóloga.

Las regiones-H presentes en la molécula de ácido nucleico pueden ser de una longitud variable comprendida entre 100pb a 3kb, siendo su longitud preferida alrededor de un tamaño de 900pb-1kb en una realización particular.

35 En una realización particular, las regiones-H presentes en la molécula de ácido nucleico no contienen modificaciones (mutación) respecto a la secuencia original, figura-2a.

En una realización particular al menos una de las regiones-H presentes en la molécula de ácido nucleico puede contener al menos una modificación (mutación) respecto a la secuencia original. Si existen varias mutaciones, la patente se referirá a las mismas denominándolas región-E (por región de edición). Esta región-E podrá tener cierta
 5 homología con el gen diana o locus a editar estando presente dentro de las regiones-H. Durante el proceso de edición genómica estas modificaciones pasaran a formar parte del gen diana presente en el material genético de la célula, figura-2b.

En otra realización particular la molécula de ácido nucleico constara de una o más regiones-E que contienen las modificaciones génicas que se quieren incorporar al material
 10 genético de la célula. Durante el proceso de edición genómica estas modificaciones pasaran a formar parte del gen diana presente en el material genético de la célula.

En otra realización particular, la región-E contenida en la molécula de ácido nucleico no tendrá ninguna homología con el gen diana o locus a editar y esta intercalada entre las regiones H y regiones-T de la molécula de ácido nucleico. Esta región-E puede codificar
 15 por ejemplo y sin estar limitada por, una secuencia, una parte de un gen, un intrón, un exón o todo un gen. Durante el proceso de edición genómica esta región-E pasara a formar parte del material genético de la célula, quedando intercalada en un punto concreto del locus o gen diana donde antes no se encontraba.

El punto de inserción de la región-E en el genoma de la célula viene determinado por la
 20 secuencia de las regiones-H, en función de las mismas la región-E se puede posicionar con una precisión exacta en el gen diana o locus presente en el material genético de la célula, pudiendo de esta manera por ejemplo y sin limitación, añadir o sustraer secuencias sin alterar el marco de lectura de la codificación del gen diana.

En una realización particular la secuencia de ácido nucleico de la invención contiene una
 25 región-E situada entre la región-H y la región-T según el sentido de la transcripción 5'-3'. En otra realización particular, la región-E se sitúa entre la región-T y la región-H según el sentido de la transcripción 5'-3', y en una tercera realización particular, existen dos regiones-E que contienen la modificación genómica situadas entre ambas regiones H-T y T-H según el sentido de la transcripción 5'-3', figura-2c.

En otra realización particular la molécula de ácido nucleico puede contener una o más
 30 modificaciones en la secuencia de al menos una de las regiones de homología-H y/o contener al menos una región-E, figura-2d.

Las modificaciones anteriormente mencionadas pueden tener el propósito de editar la información genética del locus o gen diana con efecto de corregir una mutación presente,
 35 generar una mutación, o insertar al menos un gen, parte de un gen o secuencia en el locus diana. Dichas modificaciones pueden ser por sustitución, adición o eliminación de una o

más bases respecto a la secuencia original, pudiendo generar por ejemplo y sin limitación, mutaciones transicionales, transversionales, mutaciones de corrimiento estructural o marco de lectura, mutaciones en los sitios de secuencias de corte y empalme (secuencias de *splicing*), así mismo pueden contener secuencias de más de un nucleótido (con o sin

5 homología con la secuencia del gen o locus diana) o eliminar secuencias de más de un nucleótido. Dichas modificaciones pueden abarcar el uso de bases o nucleótidos modificados o análogos conocidos de nucleótidos naturales.

Las modificaciones anteriormente mencionadas pueden tener el propósito de modificar el gen diana sin cambiar la codificación del mismo. Estas modificaciones pueden ser

10 mutaciones silentes que no alteren la codificación del gen o locus diana y que estén destinadas por ejemplo y sin limitación a alterar la secuencia de forma a crear o disrumpir: secuencias dianas de restricción y/o sitios de reconocimiento de nucleasas, y/o sitios de unión a cebadores, y/o secuencias de unión con proteínas activadoras, y/o secuencias de unión con proteínas represoras y/o secuencias de unión con otras enzimas.

Este método y molécula de ácido nucleico también pueden utilizarse para eliminar parte de la secuencia del gen diana o locus presente en el material genético de la célula (figura-3); A tal efecto en una realización particular de la molécula de ácido nucleico las dos regiones-H son homologas a la secuencia del gen diana o locus que se desee conservar, pero están diseñadas de forma que existe una separación equivalente a la secuencia que

15 se quiere eliminar, o dicho de otro modo sus secuencias no solapan con la secuencia del gen diana, dejando una separación entre ellas. Dicha separación corresponde al fragmento del gen diana que se elimina del material genético de la célula una vez se haya completado la edición genética. El método para esta realización particular no varía del expuesto siendo el mismo; Las nucleasas codificadas en la molécula de ácido nucleico una

20 vez expresadas, reconocen y cortan un alelo del gen diana (figura-3a) y mediante el mecanismo de reparación por homología de secuencia se integra la molécula de ácido nucleico en el alelo cortado (figura-3b); Las nucleasas cortan el alelo restante del gen diana y se repara el corte por el mecanismo de recombinación homóloga utilizando como plantilla el alelo previamente modificado (figura-3c). Una vez que ambos alelos están

25 modificados se escinde el trasposón compuesto por las regiones T-R-T en ambos alelos, dejando por resultado una mutación por delección en la secuencia del gen diana de forma homocigota (figura-3d).

La molécula de ácido nucleico objeto de la invención, consta de dos regiones-T que codifican para el inicio y final de un elemento transponible. Estos elementos transponibles

35 pueden ser, y no están limitados por, regiones LoxP incluyendo todas las variantes de la misma, regiones FRT incluyendo todas las variantes de la misma, regiones codificantes para trasposón *piggyBac*, sus secuencias (ITR) asociadas y variantes de la misma,

regiones codificantes para el trasposón *Sleeping Beauty*, sus secuencias (IR/DR) asociadas y variantes de la misma, y regiones codificantes para el trasposón *Sandwich* y sus secuencias (IR/DR) asociadas y variantes de la misma entre otras secuencias transponibles.

- 5 En una realización particular de la molécula de ácido nucleico se utilizan como regiones-T las secuencias codificantes IR/DR el trasposón *Sleeping Beauty*, y en una realización preferente se utiliza como regiones-T las secuencias codificantes ITR del trasposón *piggyBac*.

10 En caso de querer editar un gen con el sistema propuesto en esta patente habrá que tener en cuenta la secuencia residual que los elementos transponibles (T) dejan al escindirse del genoma; En el caso del trasposón *piggyBac*, su escisión deja una adición de nucleótidos que conforman la secuencia TTAA; En el caso del trasposón *Sleeping Beauty* su escisión deja una adición de nucleótidos que conforman la secuencia TA; En el caso de la escisión de dos secuencias directas de recombinación LoxP su escisión deja una secuencia LoxP
15 integrada en el genoma y otra en el elemento episomal escindido; En el caso de la escisión de dos secuencias de recombinación FRT su escisión deja una secuencia FRT integrada en el genoma y otra en el elemento episomal escindido.

La molécula de ácido nucleico objeto de la invención contiene la región-R comprendida entre las dos regiones (T). En el contexto de la invención la secuencia T-R-T conforma el
20 elemento transponible que será escindido del genoma una vez se haya producido la integración de la molécula de ácido nucleico en los dos alelos del gen o locus diana.

Se entiende por elemento transponible en el contexto de la patente una región incluida dentro de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención que está definida por una región que codifica para el inicio de un elemento transponible (región-T), una región que
25 codifica para un conjunto de proteínas necesarias para que el método objeto de la invención pueda llevarse a cabo (región-R) y una región que codifica para el final del elemento transponible (región-T).

La escisión del elemento transponible T-R-T está condicionado por la expresión y actividad de una proteína recombinasa como por ejemplo y sin limitación, la recombinasa Cre y sus
30 posibles variantes; la recombinasa Flipasa y sus posibles variantes; la transposasa SB-transposasa y sus posibles variantes (como SB10X, SB100X); y la transposasa PB-transposasa y sus posibles variantes (Como HyPBase, ePBase). Esta escisión elimina el elemento transponible contenido en la molécula de ácido nucleico eliminando todas las regiones-T y regiones-R integradas en ambos alelos del material genético, dejando
35 exclusivamente las mutaciones y/o regiones-E deseadas de una forma precisa en ambos alelos.

En una realización particular del método propuesto en la patente, la expresión de la recombinasa puede obtenerse introduciendo una molécula de ácido nucleico en las células que codifique para dicha recombinasa bajo el control de un promotor.

5 En otra realización particular de la molécula de ácido nucleico, la codificación de la recombinasa necesaria para escindir el elemento transponible puede estar incluida en la región-R presente entre las dos regiones-T que conforman el elemento transponible, activando su expresión y/o función de forma condicionada, mediante mecanismos como por ejemplo y sin limitación, expresión controlada por un promotor inducible o reprimible, moléculas represoras o activadoras, represión de la traducción mediante moléculas de
10 ARN de interferencia, etc.

La región (R) porta las secuencias que codifican para expresión de varias proteínas necesarias para que el método descrito en la patente pueda llevarse a cabo. Existen secuencias en la región-R esenciales para este método como son las secuencias (N) que codifican para las nucleasas y las secuencias (S) que contienen los genes de selección. La
15 región (R) puede contener otras secuencias facultativas, que no son necesarias para que el método se lleve a cabo, aunque facilitan en gran medida los procesos de identificación, selección y expansión de los clones seleccionados como las secuencias (M) que codifican para proteínas marcadoras y secuencias (P) que codifican para proteínas de proliferación celular.

20 La organización y el orden de las secuencias N-S-M-P dentro de la región-R en el sentido 5'-3' de la transcripción es irrelevante siempre y cuando aseguremos su expresión, pudiendo estar organizadas dichas secuencias en forma de genes policistronicos, en genes discretos o en una combinación de ambos. Atendiendo al orden en el sentido 5'-3' de la transcripción de dichas secuencias se pueden disponer en cualquier orden y
25 permutación siempre y cuando estén flanqueadas por las secuencias definidas como regiones-T ya que como se comentó anteriormente esta región-R forma parte del elemento transponible y será escindida del gen o locus diana en ambos alelos, (figura-4).

30 En una realización preferente la región-R, presente en la molécula de ácido nucleico, estará compuesta en el sentido 5'-3' de la transcripción por un gen policistrónico que porta las secuencias N-M seguido por un segundo gen policistrónico que porta las secuencias S-P. Esta configuración particular es preferida ya que minimiza el riesgo de falsos positivos durante el proceso de selección de las células o clones recombinantes.

35 En otra realización preferente la región-R, presente en la molécula de ácido nucleico, estará compuesta en el sentido 5'-3' de la transcripción por un gen policistrónico que porta las secuencias N-M seguido por un segundo gen que porta la secuencia S.

A continuación se detallan las características de las secuencias N-M-S-P:

La secuencia (N) presente en la región-R de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención es codificante para las proteínas nucleasas. Estas nucleasas son necesarias para llevar a cabo el método ya que efectúan el corte en los dos alelos del gen o locus diana. Dicha secuencia codifica para nucleasas como por ejemplo, y no limitadas por, endonucleasas homing (EHs) y sus variantes, nucleasas de dedos de zinc (ZFN: del inglés *zinc finger nucleases*) y sus variantes, nucleasas TALE (TALEN: del inglés *transcription activator-like effector nuclease*) y sus variantes o endonucleasas de DNA dependiente de RNA del sistema CRISP/Cas9 (CRISP: del inglés *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*) así como su correspondiente gRNA guía y sus variantes (como la *CRISPR-Cas9 nickase*). Dichas nucleasas pueden ser de los tipos anteriormente descritos aunque no se limitan a los mismos.

Es imprescindible para que el método se pueda llevar a cabo que las nucleasas estén diseñadas para reconocer y cortar el gen diana o locus en la zona de homología delimitada por las dos regiones-H, de forma que las zonas del gen o locus diana adyacentes al sitio del corte presenten homología con las regiones-H de la molécula de ácido nucleico.

La secuencia (S) presente en la región-R de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención es codificante para las proteínas de resistencia y selección. La secuencia (S) es necesaria para llevar a cabo el método ya que su expresión permite seleccionar: i) Las células o clones que hayan sufrido el evento de corte en el gen o locus diana y el evento de integración de la molécula de ácido nucleico en el gen o locus diana en al menos uno de sus alelos. ii) Las células o clones que hayan sufrido el evento de escisión del elemento transponible T-R-T presente en la molécula de ácido nucleico integrada en los dos alelos del gen o locus diana.

La secuencia (S) codifica para proteínas de resistencia y selección tanto positivas como negativas y/o proteínas con doble función positiva y negativa. En el contexto de la patente se entiende como selección positiva aquella resistencia a antibióticos u otra molécula tóxica que es otorgada a la célula gracias a la expresión de una proteína. La selección negativa se entiende como un efecto lítico producido en la célula consecuencia de la expresión de una proteína o de su actividad metabólica ante un precursor inocuo que genera un producto tóxico.

La secuencia (S) puede codificar por ejemplo y sin limitación, al menos una proteína capaz de generar resistencia a antibióticos o moléculas líticas (selección positiva).

La secuencia (S) puede codificar por ejemplo y sin limitación, al menos una proteína capaz de generar un evento de selección negativo como la proteína derivada del gen timidinkinasa de herpesvirus *HSV-TK* que en presencia de ganciclovir o FIAU elimina la célula, o la proteína derivada del gen *iCasp-9* que en presencia de un agente dimerizador (AP20187 o *B/B-Homodimerizer*) provoca la dimerización de la proteína y su activación eliminando la célula, o genes cuya expresión sea lítica, de manera que sean activados (o que dejen de estar reprimidos) de forma condicionada gracias al uso de promotores inducibles (como por ejemplo sistemas activados por tetraciclina Tet-On, Tet-OFF, pTRE3G) o sistemas represores.

10

En una realización particular la secuencia (S), presente en la molécula de ácido nucleico codifica para al menos una proteína de fusión bi-funcional como por ejemplo, la proteína derivada del gen *puDeltatk* que confiere resistencia a puromicina y es lítica en presencia de ganciclovir o 1-(2-deoxy-2-fluoro-1-beta-D-arabino-furanosyl)-5-iodouracil (FIAU).

15

Adicionalmente la región-R de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención puede contener secuencias (M) codificantes para proteínas marcadoras. La secuencia-M no es esencial para que el método se realice, pero facilita en gran medida los procesos de identificación y selección de las células que hayan integrado dicho ácido nucleico en el gen o locus diana. Esta selección y purificación puede efectuarse por diversidad de técnicas atendiendo a la naturaleza de la proteína marcadora (M) codificada en el ácido nucleico objeto de la invención.

20

En una realización preferente la secuencia (M) codifica para al menos una proteína marcadora fluorescente, ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, sin limitación, GFP, Turbo GFP, copGFP, tdTomato, IRFP, mEmerald, venus, SYFP2, DsRed, EBFP, EYFP, Cerulean, ECFP. Esta fluorescencia se utiliza para identificar y seleccionar las células por un citómetro de flujo, de manera que seleccionaremos únicamente las células que expresen de forma estable los genes presentes en la región-R de la molécula de ácido nucleico.

30

En una realización particular la secuencia (M) codifica para al menos una proteína marcadora de superficie, entendiéndose en el contexto de la patente como marcador de superficie cualquier proteína que se localice en la superficie de la célula y que pueda ser utilizada para detectar y aislar la célula que la expresa de la que no la expresa por diversas técnicas, entre ellas y sin limitación, técnicas de citometría de flujo, técnicas magnéticas de aislamiento y separación celular, detección por anticuerpos, immunopanning, etc. Ejemplos

35

de proteínas marcadoras de superficie incluyen, sin limitación, marcadores de diferenciación leucocitaria, y cúmulos de diferenciación (CD).

Adicionalmente la región-R de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención puede
5 contener secuencias (P) codificantes para proteínas de proliferación celular. En el contexto de la patente se entiende como proteína de proliferación celular cualquier proteína que expresada dentro de la célula estimule su proliferación y división y/o inhiba vías apoptóticas, ejemplos de proteínas de proliferación incluyen, sin limitación, proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), inhibidores de la activación de la ruta de las caspasas
10 (CrmA, p35, Bcl-2,...) y proteínas inmortalizadoras (EBNA.LP, hTERT, H2RSP, etc.)

Adicionalmente la región-R de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención puede contener secuencias (P) que codifiquen para uno o más RNA interferentes que estén relacionados con eventos de proliferación celular. En el contexto de la patente se entiende
15 como RNA interferente tres grandes grupos de moléculas de ácido ribonucleico (siRNA, miRNA y piRNA) que modulan el patrón de expresión de los genes presentes en el material genético de la célula. Ejemplos de RNA interferentes relacionados con proliferación incluyen sin limitación, inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (miR-24) y miRNAs inmortalizadores (miR-155).

20

Otro aspecto de la invención se refiere al método para modificar el material genético de la célula de forma que la modificación o edición génica resultante esté presente en los dos alelos del gen diana o de la región del material genético diana. Este método comprende las siguientes etapas:

25

i) Proporcionar e introducir en la célula la molécula de ácido nucleico citada anteriormente de forma que esta pueda llegar al núcleo celular y expresar los genes presentes en la región-R. En este momento la molécula de ácido nucleico introducida tiene un carácter episomal y por tanto la expresión de los todos los genes presentes en la región-R (secuencias N, S, M y P) también será transitoria a
30 menos que se den los siguientes eventos: 1) La nucleasa codificada en la secuencia (N) de la molécula de ácido nucleico reconoce la región del gen diana o locus presente en el material genético de la célula y efectúa el corte del alelo (figura-5a) sobre la secuencia reconocida. 2) Se produce un evento de reparación por recombinación homóloga entre las regiones del genoma que flanquean el sitio del
35 corte y las dos regiones-H presentes en la molécula de ácido nucleico introducida en la célula (figura.5b). En base a estos dos eventos la molécula de ácido nucleico se ha integrado en uno de los alelos del gen o secuencia diana presentes en la célula y por tanto la expresión de los genes presentes en la región-R (secuencias N, S, M y

P) pasa de ser episomal (transitoria) a estable. En este momento el alelo que porta la molécula de ácido nucleico integrada se comporta como un gen *homing endonuclease*^[2] por sus siglas en inglés, y la expresión constitutiva de las nucleasas codificadas en (N) tendrá por resultado el corte del alelo restante (figura-5c). Si el corte de este alelo se repara por el mecanismo de NHEJ la diana de corte se regenera, y las nucleasas lo volverán a cortar de forma rutinaria hasta que se produzca un evento de reparación por homología utilizando como plantilla el alelo que porta la molécula de ácido nucleico, copiándolo en el alelo donde se ha producido el corte. En este punto los dos alelos integran la molécula de ácido nucleico de forma homocigota duplicando la dotación genómica en la célula para los genes presentes en la región-R, (figura.5d).

ii) Seleccionar las células que hayan integrado la molécula de ácido nucleico dentro de ambos alelos del gen diana o locus, esta selección esta mediada por la expresión de la secuencia (S) a través de la adquisición de resistencia frente a antibióticos y otros tóxicos (selección positiva), y favorecida en gran medida por la expresión de la secuencia (M) gracias a la posibilidad de detectar las proteínas marcadoras mediante citometría de flujo y otras técnicas comentadas previamente, pudiendo detectar el aumento de dotación génica y por tanto de expresión en la célula modificada de forma bialélica. Este proceso permite seleccionar todas las células en las cuales se haya producido la integración de la molécula de ácido nucleico en el locus o alelo del gen diana.

iii) Provocar la escisión de parte de la molécula de ácido nucleico de forma que solo las modificaciones deseadas permanezcan en ambos alelos del material genético de la célula modificada; Para ello se activa el elemento transponible conformado por las regiones T-R-T presentes en la molécula de ácido nucleico. La activación se lleva a cabo por diversos mecanismos dependiendo de la naturaleza del elemento transponible tal y como se ha descrito anteriormente. El elemento transponible T-R-T una vez escindido pasa a ser episomal siendo degradado en poco tiempo por la maquinaria celular (figura-5e). Esta degradación hace que todos los genes codificados en la región (R) desaparezcan y por ende su expresión.

iv) Seleccionar las células que presenten las modificaciones deseadas en ambos alelos y que hayan eliminado los elementos transponibles T-R-T: Esta selección se lleva a cabo gracias a los genes de selección (S) que estaban presentes en la

región-R mediante un evento de selección negativa. La célula que mantenga el elemento T-R-T, tanto integrado, como reintegrado al azar o en estado episomal, morirá. Tras el proceso de selección las células resultantes, tendrán integradas en ambos alelos únicamente las modificaciones génicas deseadas anteriormente descritas.

5

En el contexto de la invención, el termino ácido nucleico, secuencia y pares de bases; hacen referencia a ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico, secuencias de nucleótidos y longitud de las secuencias en función del número de nucleótidos que contiene. En el contexto de la invención, el termino ácido nucleico y secuencia pueden estar conformados por moléculas tanto lineares o circulares, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria, estos términos pueden abarcar análogos conocidos a nucleótidos naturales, así como nucleótidos modificados respetando el código de emparejamiento con los nucleótidos originales.

10

15

Cuando la molécula de ácido nucleico objeto de la invención, es un ácido desoxirribonucleico su secuencia estará adaptada al uso preferente del codón para el organismo en concreto, ya sea animal, vegetal o humano.

20

La introducción de la molécula de ácido nucleico en la célula o en el sujeto puede ser efectuada por ejemplo y sin limitación, a través del uso de vectores virales que contienen dicha molécula de ácido nucleico, o mediante el uso de otros vectores o métodos fisicoquímicos no virales existentes conocidos por el experto en la materia.

25

En una realización particular, la molécula de ácido nucleico se transfecta en forma de plásmido, en otra realización particular se transfecta en forma de minicírculo mediante el proceso de nucleofección, y en otra realización particular la molécula de ácido nucleico se transduce mediante el uso de vectores virales.

30

En una realización particular la molécula de ácido nucleico se administra a células en cultivo (*in-vitro*), y una vez finalizado el método se introducen dichas células al organismo o paciente (*ex-vivo*), y en otra realización particular la molécula de ácido nucleico se administra al organismo o paciente (*in-vivo*).

35

En el contexto de la patente se entiende por secuencia de reconocimiento, sitio de reconocimiento y sitio de unión; una secuencia presente en el material genético de la célula que es reconocida por un polipéptido o proteína tal como por ejemplo y sin limitación

las nucleasas y otras enzimas de restricción, uniéndose al material genético en esa secuencia y provocando el corte del material genético en la región circundante a la misma.

5 En el contexto de la patente la célula puede ser de origen humano, animal o vegetal. En una realización preferente la célula es de origen humano como por ejemplo y sin limitación, células madre hematopoyéticas (HSC), derivadas de biopsias de medula ósea o de unidades de sangre de cordón umbilical, Linfocitos o células madre pluripotente inducidas (iPS), y otras células del organismo o paciente derivadas de biopsias o explantes.

10 En el contexto de la patente la expresión “gen diana o locus” define una región concreta del material genético de la célula que se desea modificar, la molécula objeto de la invención tiene que ser adaptada en función de la secuencia del gen diana o locus seleccionado. Dicho diseño comprende el dotar a la molécula de ácido nucleico de unas regiones-H homologas a la secuencia del gen diana o locus así como adaptar la secuencia
15 que codifica el dominio de reconocimiento y unión del DNA de las nucleasas codificadas en la región-R para que estas reconozcan y corten de forma dirigida la secuencia del gen diana.

La molécula de ácido nucleico objeto de la invención y su método se utiliza de forma
20 ventajosa para editar de forma bialélica un gen diana o locus presente en el material genético, pudiendo cambiar a voluntad la codificación de dicho gen sin dejar cicatriz génica. En el contexto de la patente se entiende por cicatriz genética, cualquier secuencia residual que de forma no intencionada se haya insertado de forma definitiva en el material genético de la célula modificada.

25 Otro aspecto de la invención se dirige al uso de la molécula de ácido nucleico como composición terapéutica y su uso como medicamento o tratamiento de una gran variedad de enfermedades genéticas derivadas de una codificación anómala en su genoma tales como, y a modo de ejemplo no limitativo, deficiencia de la prolidasa, siliadosis, galactosiliadosis, α manosidosis, β manosidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, la
30 enfermedad de Schindler, leucodistrofia metacromática, deficiencia múltiple de sulfatasa, leucodistrofia floboides, enfermedad de Pompe, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Wolman y la enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterilo, picnodistostosis, ceroidolipofuscinosis, cistinosis, enfermedad de Salla, mucopolipidosis III o
35 IV, la enfermedad de Danon, ceroidolipofuscinosis 6y 8, la enfermedad de Chediak Higashi, las enfermedades de Griscelli tipo 1, 2 y 3, la enfermedad de Hermansky Pudliak 2, retinosquisis ligada a X, la enfermedad de stargardt, coroideremia, retinosis pigmentarias 1-57, acondroplasia, acromatopsia, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia

de adenosina desaminasa (OMIM N° 102700), la adrenoleucodistrofia, síndrome de Aicardi, alfa-1 antitripsina, alfa-talasemia, síndrome de insensibilidad a andrógenos, síndrome de Apert, arritmogenia del ventrículo derecho, la displasia, ataxia telangiectasia, síndrome de Barth, beta-talasemia, síndrome de Bean, enfermedad de Canavan, enfermedades granulomatosas crónicas (CGD), síndrome Cri du Chat, fibrosis quística, enfermedad de Dercum, displasia ectodérmica, anemia de Fanconi, fibrodisplasia osificante progresiva, el síndrome de X frágil, galactosemia, enfermedad de Gaucher, gangliosidosis generalizada (por ejemplo, GM1), hemocromatosis, la mutación de la hemoglobina C en el codón 6.sup.th de beta-globina (HBC), la hemofilia, la enfermedad de Huntington, síndrome de Hurler, la hipofosfatasa, síndrome Klinefleter, Enfermedad Krabbes, Síndrome de Langer-Giedion, deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD, OMIM N° 116920), leucodistrofia, el síndrome de QT largo, síndrome de Marfan, síndrome de Moebius, mucopolisacaridosis (MPS), el síndrome de la rótula del clavo, diabetes insípida nefrogénica, la neurofibromatosis, la enfermedad Neimann-Pick, la osteogénesis imperfecta, la porfiria, el síndrome de Prader-Willi, progeria, síndrome de Proteus, retinoblastoma, síndrome de Rett, el síndrome de Rubinstein-Taybi, el síndrome de Sanfilippo, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), el síndrome de Shwachman, enfermedad de células falciformes (anemia de células falciformes), el síndrome de Smith-Magenis, síndrome de Stickler, la enfermedad de Tay-Sachs, trombocitopenia Ausente Radio (TAR), síndrome de Down, síndrome de Treacher Collins, trisomía, esclerosis tuberosa, síndrome de Down, síndrome linfoproliferativo de Tumer trastorno del ciclo de la urea, la enfermedad de von Hippel-Lindau, el síndrome de Waardenburg, el síndrome de Williams, la enfermedad de Wilson, y el síndrome de Wiskott-Aldrich, ligada a X (XLP, OMIM N° 308240).

25

El uso de la molécula de ácido nucleico como composición terapéutica y su uso como medicamento para tratar o prevenir una gran variedad de enfermedades genéticas, comprende administrar una cantidad terapéutica de las moléculas de ácido nucleico objeto de la invención y/o una cantidad de células modificadas (mediante el uso de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención) en un modelo experimental, organismo o sujeto enfermo.

30

En una realización particular dicha composición terapéutica o medicamento servirá para tratar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida provocado por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana VIH, ya que la edición genética mediada por la molécula de ácido nucleico y método de la invención puede utilizarse para disrumpir o modificar receptores de membrana utilizados por virus y bacterias de forma que estos no sean útiles a dichos patógenos para internalizarse o interactuar con las células.

35

La expresión "cantidad terapéutica" en el contexto de esta invención se refiere a la cantidad de la composición terapéutica que contiene la molécula de ácido nucleico (objeto de la invención) que, una vez administrado, es suficiente para prevenir y/o tratar uno o más síntomas derivados de la enfermedad, siendo su uso como medicamento.

5

Otro aspecto de la invención se dirige de forma preferente a un tratamiento y/o prevención del síndrome de inmunodeficiencia adquirida resultado de la infección del virus VIH.

En una realización particular de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención, el gen diana o locus seleccionado es el gen CCR5 por sus siglas en inglés *C-C chemokine receptor type 5*, el cual codifica para un correceptor de membrana (utilizado por el VIH R5 trópico para internalizarse e infectar los linfocitos-T y células reservorio).

El método y la molécula de ácido nucleico objeto de la invención adaptada al gen CCR5, aplicado a linfocitos-T y/o precursores de los mismos como por ejemplo y sin limitación, células madre hematopoyéticas (HSC), genera en última instancia linfocitos T modificados y/o precursores de linfocitos T modificados con el gen CCR5 editado de forma bialélica, de forma que este correceptor de membrana, una vez expresado, no permita la unión del virus VIH mediante las proteínas virales gp120 y gp41.

20

Un ejemplo de la edición génica bialélica del gen CCR5 mediante este método es generar la variante alélica CCR5 Δ 32 que es resistente al VIH. Los linfocitos T y/o células precursoras de los mismos generados por este método son resistentes a la internalización del virus VIH y una vez implantados en un paciente eliminan las células infectadas por el VIH (linfocitos nativos y células reservorio entre otras) aportando una cura para el SIDA.

25

Para obtener una protección permanente contra el VIH, se trasplantan células HSC del propio paciente a las que previamente se les ha editado ambos alelos CCR5 mediante el uso de la molécula de ácido nucleico y método objeto de la invención.

30

Ejemplos:

Ejemplo-1: Adaptación de la molécula de ácido nucleico para la edición bialélica del gen CCR5 (*h.sapiens*) según la invención:

La adaptación de la molécula de ácido nucleico comprende aportar dos regiones de homología, definidas en el contexto de la patente como regiones-H: En este caso SEQ ID NO: 1 para la primera región-H (que conforma el brazo de homología 5') y SEQ ID NO:2

35

para la segunda región-H (que conforma el brazo de homología 3') según el orden de la transcripción 5'-3'.

En este ejemplo la molécula de ácido nucleico no porta ninguna región-E, pero el brazo de homología 5' presenta una deleción de 32 pares de bases respecto a la secuencia del gen CCR5 presente en el material genético de la célula. Esta deleción es característica del alelo CCR5 Δ 32 que confiere resistencia a la internalización del virus VIH.

Otro aspecto de la adaptación es la modificación del RNA guía (gRNA) que utiliza la riboproteína nucleasa CRISPR/cas9 para reconocer el sitio de corte del gen diana o locus. En este caso el gRNA se diseña para la secuencia de reconocimiento SEQ ID NO:3 pero también puede utilizarse por ejemplo y sin limitación otra secuencia anexa a un motivo PAM cercana al sitio de corte como por ejemplo SEQ ID NO:4, el diseño del gRNA es conocido por el experto en la materia.

La región-T-R-T se sitúa entre las dos regiones-H y codifica para el inicio y final del trasposón piggyBac. En la región-R está presente la secuencia (N) que codifica para la proteína CRISP/Cas9 y el gRNA diseñado para la secuencia SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 y las demás secuencias acordes con las reivindicaciones de la invención.

En este ejemplo tras la escisión del elemento transponible se edita de forma bialélica la secuencia de ambos alelos del gen CCR5 pasando estos a CCR5 Δ 32 sin dejar ninguna cicatriz genética.

Ejemplo-2: Otra adaptación de la molécula de ácido nucleico para la edición bialélica del gen CCR5 (h.sapiens) según la invención.

La adaptación de la molécula de ácido nucleico comprende aportar dos regiones de homología, definidas en el contexto de la patente como regiones-H: En este caso SEQ ID NO: 5 para la primera región-H (que conforma el brazo de homología 5') y SEQ ID NO:2 para la segunda región-H (que conforma el brazo de homología 3') según el orden de la transcripción 5'-3'.

En este ejemplo la molécula de ácido nucleico porta una región-E, definida entre las posiciones 963 a 980 dentro de la primera región-H contenida en la molécula de ácido nucleico según el orden de la transcripción 5'-3', esta región-E es necesaria para modificar la secuencia de reconocimiento y unión al ADN de la nucleasa TALEN. En el ejemplo la región-E porta únicamente mutaciones silentes que no alteran la información codificada en el ADN para la secuencia de aminoácidos de la proteína. Asimismo esta primera región-H presenta una deleción de 32 pares de bases respecto a la secuencia del gen CCR5 presente en el material genético de la célula. Esta deleción es característica del alelo CCR5 Δ 32 que confiere resistencia a la internalización del virus VIH.

Otro aspecto de la adaptación es la modificación de las secuencias de reconocimiento de las nucleasas TALEN en el gen diana CCR5. En este caso las dos nucleasas TALEN complementarias entre sí se diseñan para que reconozcan la secuencias SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7. El reconocimiento de estas secuencias por parte de las TALENs se obtiene modificando la secuencia de RVD de las TALENs, conocida por el experto en la materia.

La región-T-R-T se sitúa entre las dos regiones-H y codifica para el inicio y final del trasposón piggyBac. En la región-R está presente la secuencia (N) que codifica para las dos proteínas nucleasas TALEN y las demás secuencias acordes con las reivindicaciones de la invención.

En este ejemplo tras la escisión del elemento transponible, la transcripción y traducción de los dos alelos modificados tendrá por resultado la expresión de la proteína variante CCR5Δ32, sin embargo en la secuencia de ambos alelos estarán presentes las mutaciones silentes de la región-E (mutaciones presentes en las bases número 963, 965, 966, 968, 971, 974, 977, 980 de SEQ ID NO:5).

Los nombres de región-H, región-T, región-R, región-E, secuencia (M), secuencia (N); secuencia (S) y secuencia (P) utilizados en esta patente son meramente ilustrativos y sirven para definir la estructura y composición de la molécula de ácido nucleico objeto de la invención. El nombre de las citadas secuencias y regiones no es relevante ni es limitativo de la invención.

BIBLIOGRAFIA

1. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
2. Burt, A. and V. Koufopanou, *Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(6): p. 609-15.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico compuesta por: Dos regiones-H de homología con el locus o gen a editar, dos regiones-T que conforman un elemento transponible, una
5 región-R que porta las regiones codificantes de proteínas necesarias para que el método de edición genómica bialélica se lleve a cabo, y adicionalmente una o más modificaciones genómicas que se quiere incorporar en el material genético de la célula denominadas regiones-E. Dichas regiones-E pueden ser independientes de las regiones-H y/o estar presentes dentro de las regiones-H en forma de al menos
10 una mutación respecto a la secuencia de homología.
2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, donde los elementos que la componen están ordenados en sentido 5´-3´ de la transcripción de la siguiente forma: H-T-R-T-E-H , o bien están ordenados en sentido 5´-3´ de la transcripción de
15 la siguiente forma: H-E-T-R-T-H
3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, donde los elementos que la componen están ordenados en sentido 5´-3´ de la transcripción de la siguiente forma: H-E-T-R-T-E-H.
20
4. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, donde los elementos que la componen están ordenados en sentido 5´-3´ de la transcripción de la siguiente forma: H-T-R-T-H, estando la/las modificaciones genómicas que se pretende incorporar en el genoma de la célula presentes por lo menos en una de las dos
25 regiones-H.
5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, donde los elementos que la componen están ordenados en sentido 5´-3´ de la transcripción de la siguiente forma: H-T-R-T-H, y que puede no contener modificaciones genómicas que se pretendan incorporar. Esta molécula se utiliza para eliminar una secuencia específica (de al menos una base) del gen diana o locus presente en la célula. Después del proceso de edición con esta molécula, se elimina una porción de secuencia del gen diana debido a una separación en la codificación entre las dos
30 regiones-H presentes en la molécula de ácido nucleico objeto de la invención. Para más referencias del método ambos ejemplos descritos en la patente utilizan esta metodología, explicada en “exposición detallada de la invención pagina7 linea12”
35
6. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 5, en donde la región-R codifica para las siguientes proteínas: al menos una proteína nucleasa (N), y al

menos una proteína de selección (S). La secuencia codificante de dichas proteínas (N-S) puede estar organizada en esta región en forma de genes separados o bien estar codificados en genes policistronicos o presentar una mezcla de genes separados y policistronicos. Siendo el orden de codificación de dichas proteínas en el sentido 5'-3' de la transcripción (N-S o S-N) irrelevante para el método propuesto en esta patente.

5

10

15

7. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 6 donde la región-R codifica al menos una proteína nucleasa (N), y al menos una proteína de selección (S) y codifica de forma adicional una o varias proteínas marcadoras (M), y/o una o varias proteínas de proliferación celular (P). Dichas codificaciones adicionales no son imprescindibles para que el método se realice pero son adyuvantes al mismo. La secuencia codificante de dichas proteínas (N-S-M-P) puede estar organizada en esta región en forma de genes separados o bien estar codificados en genes policistronicos o presentar una mezcla de genes separados y policistronicos. Siendo el orden de codificación de dichas proteínas en el sentido 5'-3' de la transcripción irrelevante para el método propuesto en esta patente.

20

8. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 6, en donde la región-R consta solo por secuencias codificantes de proteínas nucleasas (N), y secuencias codificantes de proteínas de resistencia y selección (S).

25

9. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 7, en donde la región-R consta solo por secuencias codificantes de proteínas nucleasas (N), secuencias codificantes de proteínas de resistencia y selección (S) y secuencias codificantes de proteínas de proliferación celular (P).

30

10. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 7, en donde la región-R consta solo por secuencias codificantes de proteínas nucleasas (N), secuencias codificantes de proteínas marcadoras (M) y secuencias codificantes de proteínas de resistencia y selección (S).

35

11. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 5, en donde la región-R consta solo por secuencias codificantes de proteínas nucleasas (N), secuencias codificantes de proteínas marcadoras (M), y secuencias codificantes de proteínas de proliferación celular (P).

12. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 a 11 que codifica para proteínas nucleasas (N) como por ejemplo, y sin estar limitada a estas, endonucleasas homing (EHs), nucleasas de dedos de zinc (ZFN: del inglés *zinc finger nucleases*), nucleasas TALE (TALEN: del inglés *transcription activator-like effector nuclease*) o endonucleasas de DNA dependiente de RNA del sistema CRISP/Cas9 (CRISP: del inglés *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*) y su correspondiente RNA guía (gRNA). Dichas nucleasas pueden ser de los tipos anteriormente descritos aunque no se limitan a los mismos.
13. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 7 en donde las regiones-H están presentes en los extremos de la molécula de ácido nucleico flanqueando toda la construcción. Estas regiones-H presentan una analogía en secuencia con la región del material genético donde las proteínas nucleasas (N) provocan el corte.
14. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13, en donde las regiones-H pueden contener al menos una mutación (cambio en la secuencia) para por ejemplo y sin limitación, modificar el gen diana corrigiendo su función (o anularla), y/o generar sitios de restricción (o anularlos), y/o generar sitios de unión a cebadores (o anularlos), y/o generar sitios de reconocimiento y unión de nucleasas (o anularlos), diferenciando con esta mutación el gen modificado del gen nativo sin alterar forzosamente su codificación.
15. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13, en donde las regiones-H tienen una longitud comprendida entre 50pares de bases a 10kilo bases, siendo su longitud preferida alrededor de 900 pares de bases.
16. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 a 10, en donde la secuencia-S, presente en la región-R, codifica para al menos una proteína de resistencia y selección (S) que es capaz de generar un evento de selección positivo (supervivencia de la célula) ante la presencia de agentes de selección como por ejemplo, y sin estar limitados por, antibióticos y otros tóxicos.
17. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 a 10, en donde la secuencia-S, presente en la región-R, puede codificar para una proteína de resistencia y selección (S) que es capaz de generar un evento de selección negativo (muerte de la célula) tal como la expresión de genes líticos en presencia de algún sustrato (como por ejemplo el gen de la timidin kinasa de herpesvirus *HSV-TK*, gen de la *iCasp-9*), o

genes líticos activados de manera condicional mediante promotores inducibles (como por ejemplo sistemas activados por tetraciclina Tet-On, Tet-OFF, pTRE3G).

- 5 18. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 a 10, en donde la secuencia-S, presente en la región-R, puede codificar para una proteína de resistencia y selección (S) que es capaz de generar un evento de selección tanto positivo como negativo. Ejemplos de esa proteína pueden ser, y sin estar limitados por, proteínas de fusión bi-funcionales como la codificada por el gen *puDeltatk* que confiere resistencia a puomicina y es lítico en presencia de ganciclovir o 1-(-2-deoxy-2-fluoro-1-beta-D-arabino-furanosyl)-5-iodouracil (FIAU).
- 10
19. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, en donde la secuencia-M, presente en la región-R, codifica una o varias proteínas marcadoras (M). Dichas proteínas pueden ser proteínas marcadoras fluorescentes, como por ejemplo y sin limitación: GFP, Turbo GFP, copGFP, tdTomato, IRFP, mEmerald, venus, SYFP2, DsRed, EBFP, EYFP, Cerulean, ECFP,...
- 15
20. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en donde la secuencia-M, presente en la región-R, codifica una o varias proteínas marcadoras (M). Dichas proteínas pueden ser proteínas marcadoras de superficie, como por ejemplo y sin limitación, proteínas pertenecientes al cúmulo de diferenciación y proteínas de membrana, así como cualquier otra proteína que pueda ser utilizada para detectar y aislar la célula que la expresa.
- 20
- 25 21. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en donde la secuencia-P, presente en la región-R, codifica una o varias proteínas de proliferación celular (P) entendiendo por proteínas de proliferación celular cualquier proteína que estimule la proliferación y/o división de las células que la expresen; proteínas que inhiban vías apoptóticas, proteínas inmortalizadoras, y proteínas cuya actividad o producto de la misma confiera una ventaja de crecimiento selectivo tanto en presencia como ausencia de un sustrato. Ejemplos de proteínas de proliferación incluyen, sin limitación, proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), inhibidores de la activación de la ruta de las caspasas (CrmA, p35, Bcl-2,...) y proteínas inmortalizadoras (EBNA.LP, hTERT, H2RSP,...).
- 30
- 35 22. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en donde la secuencia-P, presente en la región-R, codifica uno o varios RNA interferentes (iRNA) como por ejemplo y sin limitación siRNA, miRNA o piRNA cuya actividad ribointerferente dé

lugar a un evento que estimule la proliferación y/o división de las células y/o que inhiba vías apoptóticas, y/o que inmortalice la célula.

- 5 23. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 a 4, en donde la molécula de ácido nucleico consta de al menos una región que contiene las modificaciones génicas deseadas que se quiere incorporar de forma permanente en el material genético de la célula (región E). Dicha región E podrá estar presente dentro de las regiones H en forma de al menos una modificación puntual de la secuencia o estar entre las regiones H-T y/o T-H codificando una secuencia, parte de un gen, 10 codificando un intrón o exón o todo un gen.
- 15 24. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas en el que dicho ácido nucleico es una molécula de ácido desoxirribonucleico y/o una o varias moléculas de ácido ribonucleico, y se encuentra tanto en forma bicatenaria como monocatenaria, tanto en configuración lineal como circular.
- 20 25. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas en el que dicho ácido nucleico contiene genes policistronicos y/o genes monocistronicos.
- 25 26. Método para modificar el material genético de una célula de forma que la modificación esté presente y sea idéntica en los dos alelos del gen o locus diana, que comprende las etapas de: i) Proporcionar e introducir en la célula la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores; ii) Seleccionar las células que hayan integrado la molécula de ácido nucleico dentro de ambos alelos del gen diana o locus; iii) Provocar la escisión de parte de la molécula de ácido nucleico de forma que solo las modificaciones deseadas (tales como sustituciones, eliminaciones o adiciones en la secuencia) permanezcan en ambos alelos del 30 material genético de la célula modificada; iv) Seleccionar las células que presenten las modificaciones deseadas en ambos alelos.
- 35 27. Método según la reivindicación 26 en donde las células, a las que se les ha modificado el material genético se identifican y seleccionan mediante la detección de las proteínas marcadoras fluorescentes codificadas en la molécula de ácido nucleico.

28. Método según la reivindicación 26 en donde las células, a las que se les ha modificado el material genético se identifican y seleccionan mediante la detección de las proteínas marcadoras de superficie codificadas en la molécula de ácido nucleico.
- 5 29. Método según la reivindicación 26 en donde las células, a las que se les ha modificado el material genético se identifican y seleccionan mediante la función de las proteínas de resistencia y selección codificadas en la molécula de ácido nucleico.
- 10 30. Método según la reivindicación 26 a 29 en donde a las células, a las que se les ha modificado el material genético se les elimina la secuencia transponible (T-R-T) mediante la activación de la recombinasa pertinente.
- 15 31. Método según la reivindicación 30 en donde las células, a las que se les ha modificado el material genético se seleccionan mediante la ausencia de función de las proteínas de selección negativa codificadas en la molécula de ácido nucleico y/o la ausencia de proteínas marcadoras fluorescentes y/o marcadoras de superficie.
- 20 32. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material genético se introduce en la célula por un sistema de vector viral y/o por un sistema de vector no viral.
- 25 33. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la molécula de ácido nucleico modifica el gen diana CCR5 por sus siglas en inglés *C-C chemokine receptor type 5*, el cual codifica para un correceptor de membrana utilizado por el VIH para internalizarse en los linfocitos T.
- 30 34. Método según la reivindicación 33, en donde la modificación del material genético se efectúa en linfocitos T.
- 35 35. Método según la reivindicación 33, en donde la modificación del material genético se efectúa en células precursoras de linfocitos T, como por ejemplo y sin limitación células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) o células pluripotentes inducidas (iPS por sus siglas en inglés).
- 36 36. Composición terapéutica que comprende al menos una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25
37. Composición terapéutica según la reivindicación 36 para el tratamiento de enfermedades hereditarias.

38. Composición terapéutica según la reivindicación 36 para el tratamiento del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA).

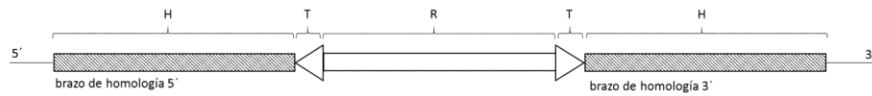


Figura.1

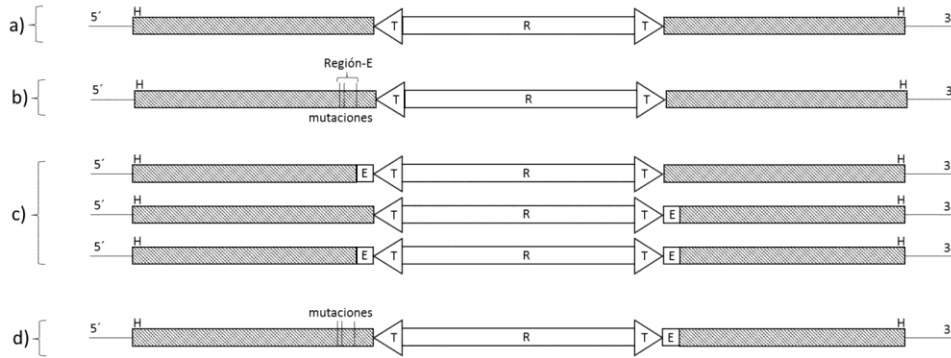


Figura.2

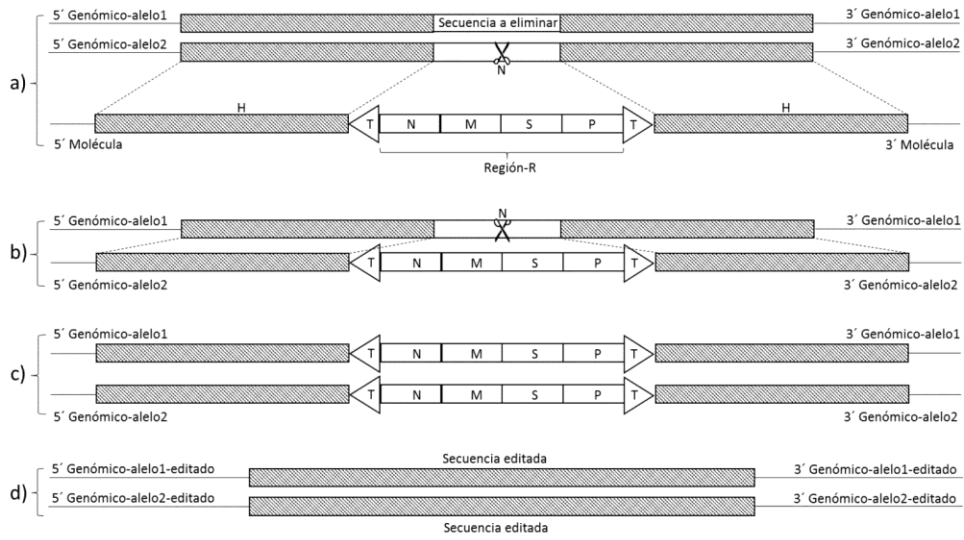


Figura.3

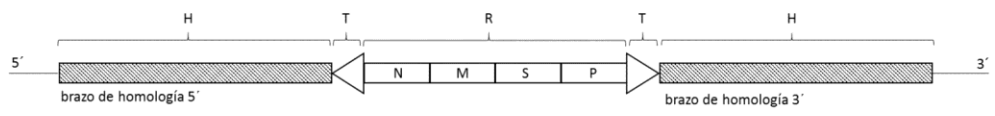


Figura.4

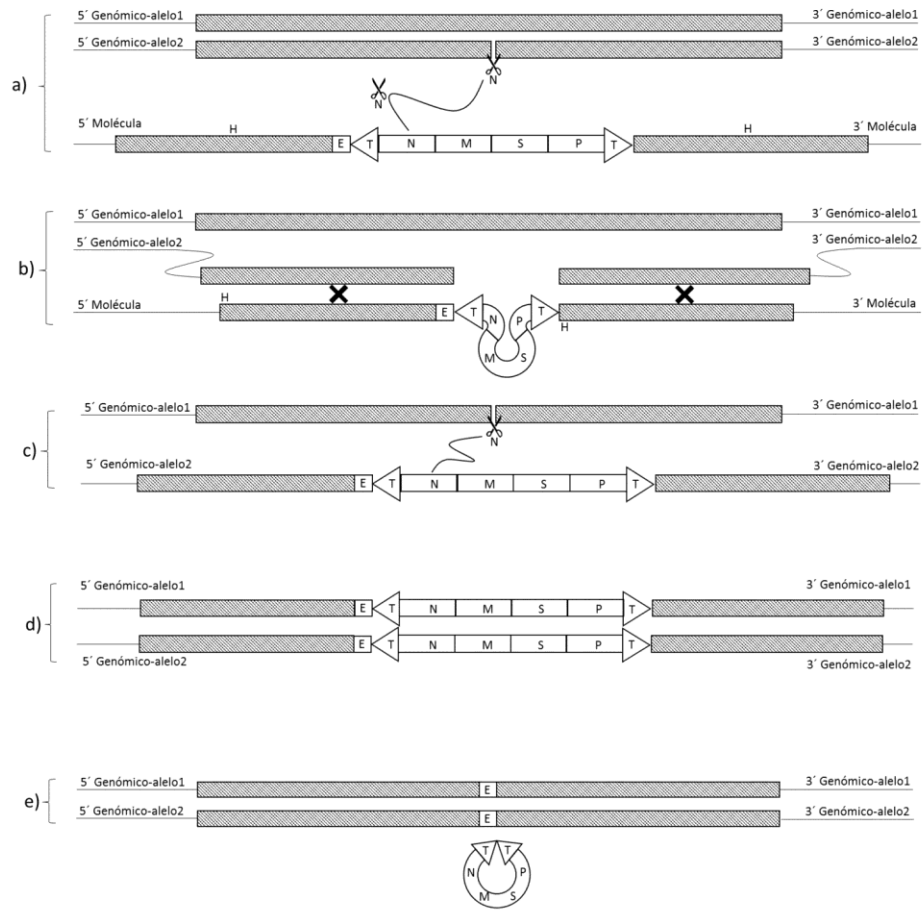


Figura.5

SECUENCIAS

<110> Víctor Miguel Gálvez Jerez

<120> Molécula de ácido nucleico y método para modificar de forma bialélica un gen diana o locus presente en el material genético de una célula

<160> 7

<210> 1

10 <211> 996

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<223> región-H presente en el brazo 5' de la molécula de ácido nucleico (versión CRISP/cas9)

15 <400> 1

tccaggctgagtgagccatgatcgtgccactgcactccagcctggcgacagagtgagaccctgtctcacaacaacaacaaca
caaaaaggctgagctgcacatgcttgaccagtttctaaaattgtgtcaaagctcattcactccatgggtgctatagagcacaagatt
ttatttggtgagatgggtgcttcatgaattccccaacagagccaagctctcatctagtggacaggggaagctagcagcaaaccttcctt
cactacaaaacttattgcttgccaaaaagagagtttaattcaatgtagacatctatgtaggcaattaaaaacattgatgataaaac
20 agtttgattcatggagggaactaaatacattctaggactttataaaagatcactttttatgacaggggtggaacaagatggatta
tcaagtgcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagccctgcaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgagcccgcctct
gcctccgctctactcactgggtgctcatttgggtttggtgggcaacatgctgggtcctcctcatcctgataaaactgcaaaaggctgaagagc
atgactgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgttttcttcttactgtccccttctgggctcactatgctgccgccagtg
gactttggaaatacaatgtgtcaactcttgacagggctctatttataggcttcttctggaatcttctcatcctcctgacaatcgat
25 aggtacctggctgctgctccatgctgtgtttgctttaaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgatcactgggtggtg
ctgtgttgctctctccaggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtctcattacacctgcagctctcattttcataca

<210> 2

30 <211> 1060

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<223> región-H presente en el brazo 3' de la molécula de ácido nucleico (versión común CRISP/cas9 y TALEN)

35

ES 2 634 802 A1

<400> 2

agatagtcattctggggctggctcctgccgctgcttgatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaactctgcttcggtgtcgaatga
gaagaagaggcacagggtgtgaggcttatctcaccatcatgattgtttatctctctgggctccctacaacattgccttctcctgaa
caccttcaggaattctttggcctgaataattgcagtagcttaacaggtggaccaagctatgcaggtgacagagactctgggatgac
5 gcactgtgcatcaacccatcatctatgcctttgtcggggagaagttcagaaactacctcttagtcttccaagcattgcctgcaaa
cgcttctgcaaatgctgttctatctcagcaagaggctcccagcagcaagctcagtttacccgatccactggggagcaggaata
tctgtgggcttgacacggactcaagtggtgacctcagagttgtgacatggcttagtttcatacacagcctgggctggg
gggtggggtgggagaggtcttttaaaaggaagtactgttatagagggtcaagattcatcatttattggcatctgtttaagtagatt
agatctttaagccatcaattatagaaagccaaatcaaaatgttgatgaaaaatagcaacctttatctccccttcacatgcatcaa
10 gttattgacaaactctccctcactccgaaagttccttatgtatattaaagaaagcctcagagaattgctgattctgagtttagtgc
tgaacagaaataccaaaattattcagaaatgtacaactttacctagtagcaaggcaacataggttgaatgtgtttaaacaggt
ctttgcttctgtaggggagaaaagacatgaatatgattagtaaagaaatgacactttcatgtgtgatttcccctcaaggtatggttaa
taagttcactgacttagaaccaggcgagagactgtggcctgggagagctggggaagc

15

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

20 <223> Secuencia de reconocimiento y unión de la nucleasa CRISPR/cas9

<400> 3

catacagtca gtatcaattc tgg

25

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

30 <223> Secuencia de reconocimiento y unión de la nucleasa CRISPR/cas9 Alternativa

<400> 4

aaagatagtc atcttggggc tgg

35 <210> 5

ES 2 634 802 A1

<211> 996

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <223> región-H presente en el brazo 5' de la molécula de ácido nucleico (versión TALEN) y mutaciones silentes en 963,965,966,968,971,974,977,980 (región-E)

<400> 5

tccaggctgagtgagccatgatcgtgccactgcactccagcctgggcgacagagtgagaccctgtctcacaacaacaacaaca
caaaaaggctgagctgacccatgcttgaccagtttctaaaattgtgtcaaagcttcattcactccatggctatagagcacaagatt
10 ttatttggtgagatggcttcatgaattccccaacagagccaagctctcatctagtgagcagggagctagcagcaaaccttcctt
cactacaaaacttcattgcttgccaaaaagagagttaattcaatgtagacatctatgtaggcaattaaaaacattgatgataaaac
agtttgattcatggagggaactaaatacattctaggactttataaaagatcactttttatgacagggtggaacaagatggatta
tcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcgagccctgccccaaaatcaatgtgaagcaaatcgagcccgcctct
15 gcctccgctctactcactggtggtcattcttggttttggtggcaacatgctggctcctcatcctgataaactgaaaaggctgaagagc
atgactgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgttttcttcttactgtccccttctgggctcactatgctgcccccagtg
gactttggaaatacaatgtgtcaactcttgacagggctctattttataggcttcttctggaatcttctcatcctcctgacaatcgat
aggtacctggctgtcgtccatgctgtgtttgctttaaagccaggacggcactttggggtggtgacaagtgtgatcactgggtggtg
ctgtgttgcgtctctcccaggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtttactatacatgtagttctcattttcataca

20 <210> 6

<211> 17



- ②① N.º solicitud: 201600262
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2459880 T3 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 12/05/2014, Página 2, línea 24 - página 3, línea 10; Fig. 1	1-38
A	ES 2228170 T3 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 01/04/2005, Página 2, línea 42 - página 3, línea 13; Figuras. 1, 2.	1-38
A	ES 2416361 T3 (TRANSGENE SA) 31/07/2013, Página 2, Línea 15 - página 3, línea 15.	1-38

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.05.2017

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H21/00 (2006.01)

C12N15/00 (2006.01)

A61P31/18 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-38	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-38	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2459880 T3	12.05.2014
D02	ES 2228170 T3	01.04.2005
D03	ES 2416361 T3	31.07.2013

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una molécula de ácido nucleico que contiene todos los elementos para i) cortar un alelo del gen diana, ii) ser utilizada como plantilla para reparación del corte realizado, iii) integrar en el gen los elementos de edición para editar el alelo restante, iv) eliminar dichos elementos en ambos alelos dejando únicamente la modificación genética deseada (reivindicaciones 1-25, 36-38); así como su uso en un método para modificar en una célula, en un solo paso de transfección, ambos alelos de un gen diana o región del genoma (reivindicaciones 26-35).

El documento D01 divulga unas moléculas de polinucleótidos lineales con brazos de homología de 50 a 100 pares de bases que flanquean una o más secuencias de interés para insertar en el genoma de una célula; así como su uso en un método para la integración dirigida de una secuencia exógena en una región específica de interés en el genoma de una célula (ver página2, línea 24 - página 3, línea 10; Fig. 1).

El documento D02 divulga un método para insertar un polinucleótido transponible en posiciones aleatorias del ácido nucleico cromosómico o extra-cromosómico de una célula diana, mediante la introducción en la célula de un complejo sináptico que contiene una transposasa y un par de secuencias de nucleótidos adaptadas para interactuar operativamente con la proteína transposasa y una secuencia nucleotídica transponible entre ellas, en condiciones que median transposiciones en el ADN celular (ver página2, línea 42 - página 3, línea 13; Figs. 1, 2).

El documento D03 divulga un vector recombinante, que contiene al menos dos moléculas de ácido nucleico, diseñado para expresar de forma independiente múltiples secuencias de nucleótidos de interés que se obtienen a partir del mismo organismo o de organismos estrechamente relacionados; así como una célula huésped y una composición farmacéutica que comprende estas moléculas y su uso con fines terapéuticos o preventivos (ver página2, línea 15 - página 3, línea 15).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-38**

Los documentos citados divulgan moléculas de ácidos nucleicos para su uso en procesos de edición genética y modificación del genoma. La principal diferencia entre estos documentos y el objeto técnico de la presente invención radica en el diseño de la molécula de ácido nucleico que en los documentos citados es útil para modificar uno de los alelos del gen diana, la molécula de la invención es capaz de modificar en una célula ambos alelos del gen diana o región del genoma en un solo paso de transfección.

De este modo, se considera que el método reivindicado en la presente invención ofrece una alternativa diferente a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-38 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (**Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986**).

Los documentos D01-D03 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente invención.